

## **II-284 - CARACTERIZAÇÃO DE FLOCOS DE LODO ATIVADO POR MEIO DE ANÁLISE DE IMAGEM: PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

**Rodrigo de Freitas Bueno<sup>(1)</sup>**

Biólogo e Engenheiro Ambiental, Mestre em Saúde Pública – Área: Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública da USP, Doutorando em Engenharia Civil – Área: Engenharia Hidráulica e Ambiental na Escola Politécnica da USP.

**Eduardo Lucas Subtil**

Oceanógrafo, Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Espírito Santo, Doutor em Engenharia Civil – Área: Engenharia Hidráulica e Ambiental na Escola Politécnica da USP.

**Jeferson Gaspar dos Santos**

Biólogo, Mestre em Saúde Pública – Área: Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública da USP, Doutorando em Ciências – Área: Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública da USP.

**Amanda Rodrigues Inácio**

Engenheira Ambiental – Área: Ambiental e Saneamento pelo Centro Universitário do SENAC.

**Renata Fernandes Mourão**

Engenheira Ambiental – Área: Ambiental e Saneamento pelo Centro Universitário do SENAC.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Belo Jardim, 118 – Jd. Mutunga – São Paulo - SP - CEP: 05159200 - Brasil - Tel: (11)983962421- e-mail: [robueno@usp.br](mailto:robueno@usp.br)

### **RESUMO**

O principal objetivo do estudo foi a validação e a padronização do método de caracterização de flocos de lodo ativado por análise de imagem, através do software gratuito ImageJ. O método mostrou-se seguro e de fácil aplicação, para quantificação e determinação do diâmetro dos flocos de lodo ativado. O método pode ser uma ferramenta eficiente e prática de baixo custo a ser incorporado nas rotinas de monitoramento de ETE's.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lodo ativado, flocos, morfologia, microrganismos, análise de imagem.

### **INTRODUÇÃO**

O tratamento de esgoto pode ser realizado por via biológica ou físico-química. A escolha entre o processo leva em conta o tipo de efluente a tratar, sua biodegradabilidade, presença de toxinas, a produção de lodos, etc. Devido ao seu menor custo e sua simplicidade operacional, o processo biológico é em geral escolhido para o tratamento de esgoto doméstico e certos tipos de efluentes industriais. Dentre os processos biológicos, o processo de lodo ativado é mundialmente o mais utilizado. Consiste basicamente em colocar o esgoto a ser tratado em contato com uma elevada concentração de microrganismos em um reator, onde ocorrem as reações bioquímicas, como a degradação da matéria orgânica. Em seguida, a biomassa microbiana pode ser separada do esgoto tratado por decantação. Para manter uma concentração de microrganismos ativos e constante no reator, uma parte da biomassa sedimentada retorna ao reator e o excesso é retirado. Os microrganismos podem crescer dispersos no meio, como é o caso dos lodos ativados, as bactérias se aglomeram sob a forma de flocos bacterianos. Estes flocos são formados segundo a teoria do esqueleto filamentoso por bactérias filamentosas, que irão dar a estrutura ao floco e por bactérias zoogleais, produtoras de exo-polímeros que servirão para unir estas bactérias formando o floco bacteriano (JENKINS *et al.*, 2003). A eficiência do processo depende, dentre outros fatores, da capacidade de floculação da biomassa ativa e da composição dos flocos formados. Sabe-se que um bom equilíbrio entre estas espécies de bactérias produz flocos com boas características de decantação e adensamento. Os principais fenômenos que ocorrem oriundos do desequilíbrio são: Lodo pulverizado ou “pin-point flocc” (PP); o intumescimento do lodo por bactérias filamentosas “bulking filamentoso” (BF) ou por bactérias não filamentosas “bulking zoogleal” (BZ) e a formação de espuma ou “foaming” (EIKELBOOM, 2000; JENKINS *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2004; SCHULER e JASSBY, 2007). Segundo os autores citados anteriormente, sabe-se que o PP é formado por uma diminuição na concentração de bactérias filamentosas, causando uma ruptura dos flocos e assim a formação de pequenos agregados que podem não decantar prejudicando a qualidade do efluente final. O BF é caracterizado por uma forte redução da velocidade de decantação, causado por um desenvolvimento excessivo de bactérias filamentosas, que está geralmente

ligado a uma carência de substrato. Estas bactérias ultrapassam largamente os limites dos flocos, aumentando a resistência à decantação e ligando uns flocos aos outros. Este fenômeno é o mais comum, sendo responsável por mais de 60% dos problemas em estações de tratamento por lodos ativados. O BZ é caracterizado por apresentar um lodo viscoso e de consistência gelatinosa que sedimentam mal. É causado por uma quantidade excessiva de polissacarídeos extracelulares (EPS). A formação de espuma ou “foaming” – como o próprio nome diz, é caracterizado pela formação de uma camada de espuma na superfície do tanque de aeração. Esta espuma é formada devido ao excesso de bactérias filamentosas, que ao contrário do caso do bulking, possuem um caráter hidrofóbico. Se não for combatida a espuma transborda causando perda de biomassa microbiana. Diante do exposto, mostra-se claro a correlação entre a eficiência do processo com o controle e monitoramento da morfologia e microbiologia do lodo ativado. A existência dessas correlações levou ao surgimento de várias metodologias de avaliação do floco do lodo ativado. Destacam-se os estudos realizados por Sezgin *et al.* (1978) para medição do comprimento total das bactérias filamentosas, o qual foi utilizado posteriormente por Palm *et al.* (1980) e Lee *et al.* (1982). Os estudos de Jenkins *et al.* (2003) resultaram em um manual de procedimentos para classificação morfológica e microbiológica dos flocos em sistemas de lodo ativado. Madoni *et al.* (1994) que estabelece o conceito de índice biológico de lodos (IBL), baseado na estrutura das populações de protozoários e pequenos metazoários para avaliar o desempenho da ETE, entre outros. No entanto, os métodos clássicos para o monitoramento do lodo ativado baseiam-se em uma observação manual com auxílio de um microscópio óptico com uma ocular dotada de micrômetro. Estas técnicas manuais, além de imprecisas, são cansativas, repetitivas e tomam bastante tempo, o que torna a sua utilização nas estações de tratamento muito trabalhosa, sendo na maioria das vezes não realizadas. Com o avanço tecnológico e científico, uma nova abordagem tem sido proposta para caracterização morfológica e microbiológica dos flocos de lodo ativado (Grijpspeerdt e Verstraete, 1996, 1997; Da Motta, *et al.* 2001; Perez, *et al.* 2006 e Mesquita, *et al.* 2011;). Estes procedimentos baseiam-se na análise computacional por meio de imagens. Estudos realizados por Da Mota, *et al.* 2003, com lodo aeróbio e anaeróbio em doze ETE's da França e de Portugal, se apresentou como uma excelente ferramenta de avaliação, onde, na preparação das amostras e aquisição das imagens se obteve resultados com erros inferiores a 5% o que dificilmente é obtido nos métodos clássicos. Os programas computacionais para o tratamento das imagens, normalmente são exclusivos e dependem de licenças, acarretando alto custo e limitações. Dentro deste contexto, a pesquisa proposta pretende validar e padronizar o método para caracterização da morfologia do floco de lodo ativado, por meio de um programa computacional de tratamento de imagem (ImageJ 1.45s) reconhecido mundialmente, desenvolvido pelo National Institutes of Health, USA, que pode ser obtido gratuitamente.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Lodo ativado e Análises laboratoriais**

Foram coletadas amostras nas unidades de tratamento de esgoto sanitário de lodo ativado do tipo convencional e aeração prolongada, instaladas no Centro Tecnológico de Hidráulica - CTH da Escola Politécnica da USP. As amostras foram coletadas diretamente no tanque de aeração e encaminhadas para o laboratório para a realização dos ensaios físico-químicos e da análise de imagem. O tempo entre coleta e o início das análises foi inferior a uma hora para evitar modificações na microfauna e mudança na estrutura dos flocos bacterianos. Os métodos analíticos (físico-químicos) e o procedimento de coleta estão descritos no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21<sup>th</sup> Edition (APHA, 2005).

### **Padronização e Validação do Método**

A fim de se obter a padronização e a validação do método de análise de imagem por meio do programa ImageJ, se estabeleceu como referência o método clássico de caracterização de flocos descrito por Jenkins, *et al.* 2003 e no Manual de Microbiologia de Lodos Ativados (CETESB, 1990). Onde se consiste na observação manual de uma lâmina de lodo ativado previamente preparada. Para validação do método foi aplicado teste estatístico básico e de correlação de Pearson.

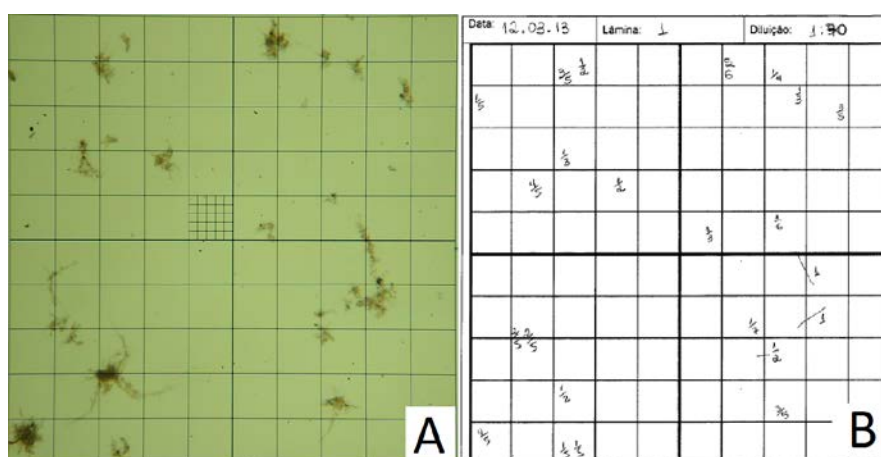
### **Preparo das amostras**

Segundo Jenkins, *et al.* (2003) e CETESB, (1990), a elevada concentração de biomassa em sistemas de lodo ativado dificulta a observação visual do floco, sendo necessária a diluição das amostras para uma posterior

análise. Os autores recomendam uma quantidade de aproximadamente 20 flocos para observação manual. A diluição é importante também para a análise computadorizada da imagem, pois se deve evitar a aglomeração de partículas que exige do software o uso de ferramentas que as segmente, o que muitas vezes induz ao erro, uma vez que esta segmentação pode alterar a imagem original, aumentando-se, conseqüentemente, os erros referentes ao uso da técnica em estudo. O lodo estudado apresentava concentrações de sólidos totais na faixa de 2500 – 3500mg/L, nesse caso as diluições que permitiram uma boa visualização e a permanência de pelo menos 20 flocos no retículo foram as de 1:50, 1:70 e 1:100. Nesse caso nenhum floco ficou sobreposto e foi considerada adequada aos testes manuais e à captura de imagem. Utilizando a diluição estabelecida, um mililitro de amostra foi depositado em uma câmara de Sedgwick Rafter e levada ao microscópio óptico, com aumento de 40 vezes. Em cada amostra foram realizadas as leituras manuais e a aquisição das imagens em dois pontos diferentes a fim de se obter na leitura manual uma média de quarenta flocos por lâmina. Cada amostra foi analisada por três observadores diferentes, a fim de diminuir a subjetividade do resultado e como resultado final utilizou-se a média aritmética das três leituras. Foram analisadas 10 amostras, totalizando 550 flocos.

### Procedimento analítico manual

A validação do método proposto se baseia na comparação do diâmetro de cada floco obtido pela análise de imagem e leitura manual. Tal comparação só é plausível se os resultados de ambas as metodologias se referirem ao mesmo floco. Assim, durante a observação microscópica (Figura 1-A) foi imprescindível a identificação e localização exata de cada floco. Para isso, utilizou-se como base das anotações um modelo do retículo, conforme apresentado na Figura 1-B:



de pixels, que são elementos primários, onde de acordo com a sua profundidade, pode assumir grande quantidade de intensidades que variam em números de tons por pixel. As bordas de uma estrutura em uma imagem digital são onde ocorrem mudanças de intensidade em certo espaço e direção, sendo assim quanto maior a diferença entre a intensidade de um objeto e seu plano de fundo, denominado *background*, mais nítidas serão as bordas dessa estrutura. Sendo assim, para se obter o dimensionamento dos flocos de lodos ativados, é necessário que a imagem passe por uma sequência de processos, visando que o programa não interfira na estrutura do floco e consiga dimensioná-lo de forma mais precisa. Tal sequência de processos, melhor visualizada na Figura 3, consiste em: 1) A partir da imagem inicial, selecionar a região de interesse, permanecendo, no caso atual, apenas a área do retículo; 2) Atribuição de escala por meio do conhecimento das dimensões do retículo, onde se indica o tamanho, em mm, em relação ao pixel da imagem; 3) Com objetivo de se remover o retículo da imagem, uma vez que não se deseja que esta estrutura seja confundida com flocos e considerada na análise das partículas, é aplicado a ferramenta *Fast Filters*; 4) Correção da luz do plano de fundo, aplica-se o *Subtract Background*; 5) *Enhance Contrast*, que faz com que o floco fique bem definido, destacando-se do seu plano de fundo; 6) A partir de então, faz-se necessário passar a imagem para 8-Bit, passando a ser em escala de cinza; 7) Aplica-se o *Subtract Background* novamente, o que faz com que os flocos fiquem ainda mais destacados do plano de fundo, facilitando a aplicação posterior do *Threshold*; 8) Em seguida, aplica-se uma sequência de *Close, Open, Close* para remoção das partículas de desinteresse; 9) Para a finalização do tratamento, aplica-se a função *Fill Holes*, a fim de preencher lacunas nos flocos. Por último, se realizam as medições das estruturas contidas na imagem por meio da função análise de partículas com as dimensões escolhidas pelo usuário. O resultado é disponibilizado em planilha eletrônica (Microsoft Excel). A Figura 3 mostra as principais etapas envolvidas no processamento das imagens.

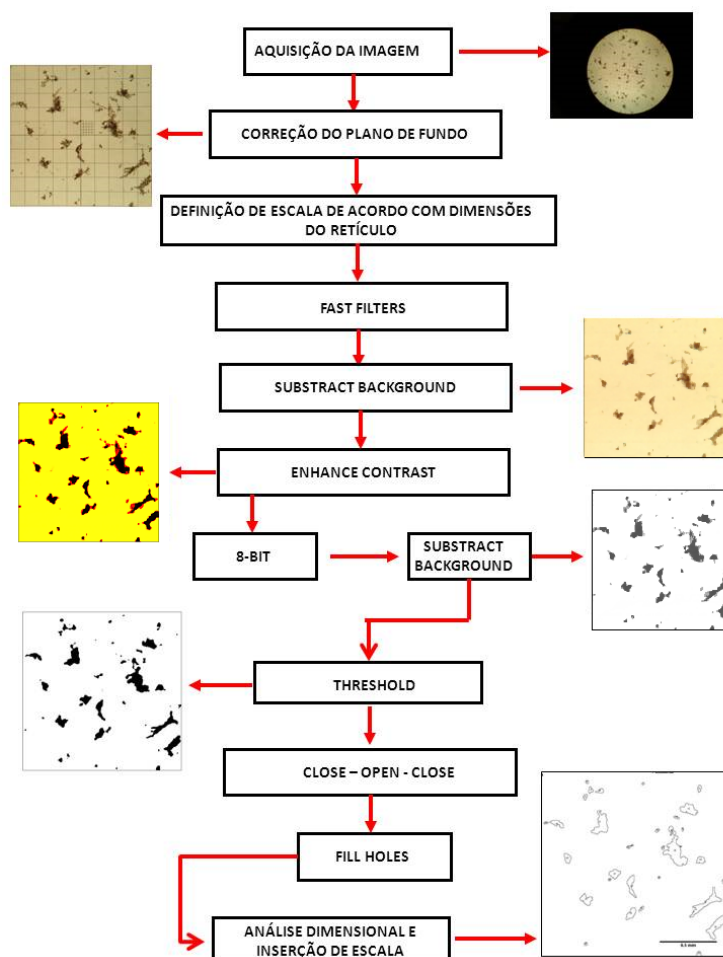


Figura 2: Representação esquemática do procedimento de análise de imagem.

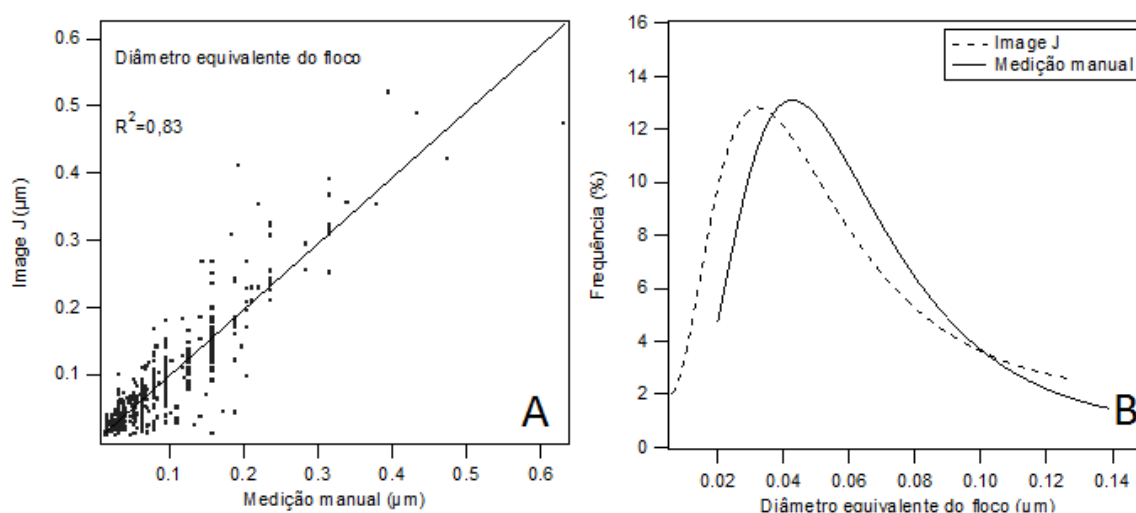
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para validação e padronização do método foram analisadas 10 amostragens com um total de 550 flocos que foram submetidos à análise pelo método clássico e ao método de análise de imagem. Na Tabela 1 podemos evidenciar os resultados médios obtidos se resultaram muito próximos.

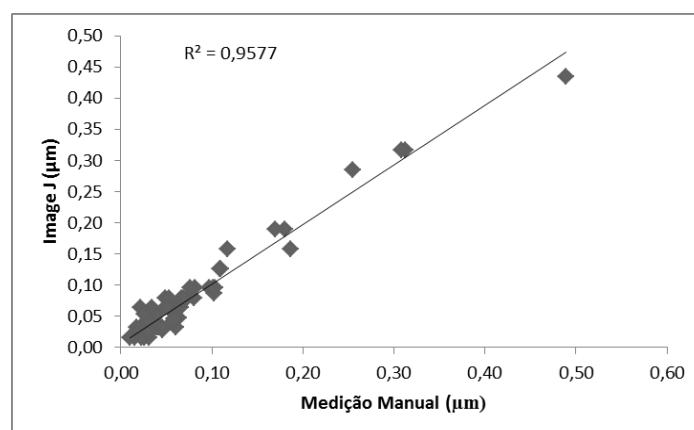
**Tabela 1: Comparativo entre os dados obtidos pela leitura manual e pelo programa de tratamento de imagem.**

Diâmetro do floco (µm) – Lodo Ativado		
Variável	Manual	Programa
Média	60	60
máximo	330	360
mínimo	20	10
DP	0,07	0,07
CV (%)	111	88
AT	0,32	0,34
Flocos analisados	550	

Com os valores obtidos no experimento, construímos a Figura A e B que apresentam os resultados estatísticos da comparação entre os métodos. Na Figura 3-A se observa o valor  $R^2$  da reta de tendência das amostras pontuais  $R > 0.83$  com significância estatística  $p < 0.280$ . Esses valores mostram uma boa aproximação dos resultados o que fica mais evidente quando comparamos estatisticamente as médias obtidas durante todo o experimento na Figura 4. Observa-se o valor  $R^2$  da reta de tendência das médias acima de  $R > 0.95$  com significância estatística  $p < 0.1$  com intervalo de confiança de 95%. Na figura 3-B se observa a correlação dos dados e a distribuição pontual do tamanho do floco. A distribuição do diâmetro médio obtido pelo ImageJ foram relativamente menores do que aqueles obtidos pela metodologia tradicional, o que pode indicar: o ImageJ consegue medir flocos de menor diâmetro ou o procedimento de processamento de imagem reduz o diâmetro equivalente do floco, o que justificaria, a priori, o deslocamento da curva de distribuição do tamanho de flocos para a esquerda.



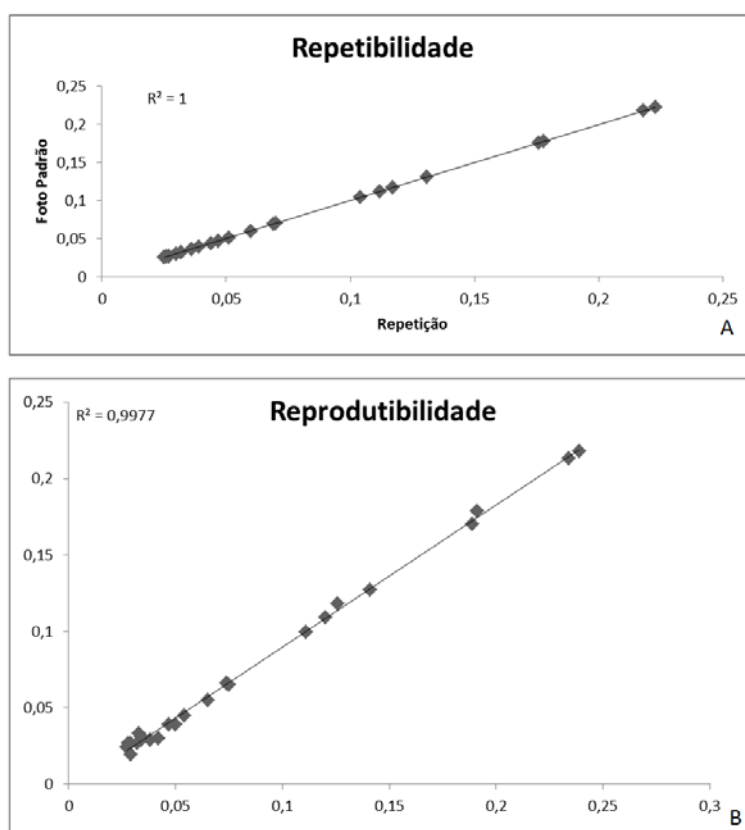
**Figura 3: Resultados dos testes estatísticos de comparação do método manua**



**Figura 4: Resultados experimentais de comparação entre o método clássico e de imagem**

### Testes de repetitividade e reprodutibilidade

Na Figura 5 A e B são apresentados os testes de repetitividade e reprodutibilidade do programa ImageJ. Observa-se o valor  $R^2$  da reta de tendência das médias acima de  $R > 0.95$  com significância estatística  $p < 0.1$  e intervalo de confiança superior 95% para ambos os testes mostrando que o programa é confiável e pode ser aplicado para determinação das características morfológicas dos flocos.



**Figura 5: Resultados experimentais de repetitividade e reprodutibilidade do imageJ**

## CONCLUSÕES

O principal resultado foi a validação e a padronização do método de caracterização de flocos de lodo ativado por análise de imagem, através do software gratuito ImageJ. O método mostrou-se seguro e de fácil aplicação, para quantificação e determinação do diâmetro dos flocos de lodo ativado mostrando-se ser uma ferramenta eficiente e eficaz na prática. Pretende-se ainda, em estudos posteriores a utilização do software para caracterização de filamentos das bactérias filamentosas, onde, possibilitará o uso dessa ferramenta de forma eficiente e prática no monitoramento de ETE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DA MOTTA, M., PONS, M.N., ROCHE, N. In. *Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis*. Water Science and Technology, v. 43,n. 7, p. 91-96, 2001.
2. DA MOTTA, M., PONS, M.N., ROCHE, VIVIER H., AMARAL A.L., FERREIRA C.E., MOTA M. In. *Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso*. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, v.8, n.3, p. 170-181, 2003.
3. EIKELBOOM, D.H., A. ANDREADAKIS AND ANDREASEN K. In. *Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries*. Wat. Sci. Technol., 37, 281-289, 1998.
4. FERREIRA, T; RASBAND, W. *ImageJ User Guide*. 2011. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>>. Acesso em 30 de agosto de 2012.
5. GRIJSPEERDT, K., VERSTRAETE, W. In. *A sensor for the secondary clarifier based on image analysis*. Water Science and Technology, v. 33, n. 1, p. 61-70, 1996.
6. GRIJSPEERDT, K., VERSTRAETE, W. In. *Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge*. Water Research, v. 31, n. 5, p. 1126-1134, 1997.
7. JENKINS D., RICHARD M. G. AND DAIGGER G. T. In. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. 3<sup>th</sup>. Lewis, London, 2003.
8. LEE, S.E, KOOPMAN, B.L., JENKINS, D. In. *The effect of aeration basin configuration on activated sludge bulking at low organic loading*. Water Science and Technology, v.14, p. 407, 1982.
9. MADONI, P., DAVOLI, D., GIBIN, G. In. *Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy*. Water Research, v. 34, n. 6, p. 1767-1772, 2000.
10. MARTINS, A.M.P., PAGILLA, K., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., In. *Filamentous bulking sludge – a critical review*. Water Res. 38, 793–817. Schuler, A.J., Jassby, D., 2007. Filament content threshold for activated sludge bulking: artifact or reality. Water Res. 41, 4349-4356, 2004.
11. PALM, J.C., JENKINS, D., PARKER, D.S. In. *Relationship between organic load, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely-mixed activated sludge process*. Journal of Water Pollution Control Federation, v. 54, p. 1087, 1980.
12. PEREZ, Y. G., LEITE, S. G .F., COELHO M. A. Z. In. *Activated sludge morphology characterization through an image analysis procedure*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, No.03, pp. 319-330, 2006.
13. SEZGIN, M., JENKINS, D., PARKER, D. S. In. *A unified theory of filamentous activated sludge bulking*. Journal of Water Pollution Control Federation, v. 50, p. 362-381, 1978.